

Benignus és malignus hiperproliferatív ill. gyulladásos bőrbetegségek pathomechanizmusának vizsgálata funkcionális genomikai módszerekkel

Témavezető: Dr. Dobozy Attila

ZÁRÓJELENTÉS

A hároméves kutatási program célja az volt, hogy genomikai módszerekkel olyan géneket azonosítsunk és jellemezzünk, amelyek szerepet játszanak benignus és malignus hiperproliferatív ill. gyulladásos bőrbetegségek pathomechanizmusában. A kutatási terv modell betegségül a pikkelysömört választottuk, mivel erre a bőrbetegségre jellemző a keratinociták hiperproliferációja és emellett gyulladásos tünetek is kísérik. Emellett 2004-ben egyéb multifaktoriális etiológiájú bőrgyógyászati kórképek genomikai vizsgálatát is megkezdjük.

Genomikai kutatások pikkelysömörben

Kutatási programunk „sarokköve” az a korábbi években elvégzett „differential display” kísérlet volt, amelynek célja a pikkelysömörös nem léziós epidermiszben eltérő expressziót mutató gének azonosítása volt. Az egyik ilyen fehérje a fibronectin EDA motívumot hordozó onkofoetális formája. 2004-ben került közlésre az a dolgozatunk, amelyben bizonyítottuk, hogy a pikkelysömörös nem léziós epidermiszből izolált keratinociták egy rövid *ex vivo* tenyésztést követően szintén kifejezik ezt a fibronectin izoformát, míg az egészséges epidermiszből származó keratinociták nem. Ezzel a kísérlettel direkt bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a pikkelysömörös nem léziós keratinociták valóban képesek a pikkelysömörös tünetek kialakítására hajlamosító EDA motívumot hordozó onkofoetális fibronectin kifejezésére. Széll M, Bata-Csörgő Zs, Pivarcsi A, Koreck A, Kemény L, Dobozy A: *Proliferating keratinocytes are putative sources of the psoriasis susceptibility related EDA⁺ oncofoetal fibronectin. J. Invest. Dermatol 123: 537-46, 2004 (IF: 4,194)*

A másik transzkript, amely jelenleg is folyó kutatásaink középpontjába került, szintén magasabban fejeződik ki a pikkelysömörös nem léziós epidermiszben a „differential display” kísérletek alapján. A génnek nincs fehérjévé átíródó terméke, hanem ún. nem kódoló RNS gén. Mivel előzetes kísérleti eredményeink alapján a pikkelysömörös tünetek kialakulására

hajlamosító faktornak tekintjük és *in vitro* kísérleteink adatai szerint különböző stresszhatásokra a gén expressziója indukálódik, a Psoriasis-susceptibility Related RNA gene Induced by Stress, PRINS nevet adtuk a génnek. Demonstráltuk, hogy a PRINS gén magasabb szinten fejeződik ki a következő stresszhatásokra:

- folyamatos inkubálás mikrobiális anyagokkal ill. *Candida albicans*-sal
- 1 órás inkubáció mikrobiális anyagokkal ill. *Candida albicans*-sal
- folyamatos indukálás HSV1-gyel
- kontakt inhibíció
- szérum éheztetés
- transzlációgátlás cikloheximiddel

Annak megértésére, hogy a PRINS gén upregulációja ezeknek a stresszhatásoknak a következtében csupán epifenon, vagy valóban szerepe van a gén termékének a sejtek stresszre adott válaszában kialakításában, RNS silencing kísérleteket végeztünk. A PRINS gén 3 különböző szakaszát építettük be olyan vektorokba, amelyek tranziens (pSilencer 2.0-U6) ill. stabil transzformációra (pSilencer 2.1-U6 hygro) alkalmasak és a transzformált sejtekben a PRINS gén expresszióját specifikusan gátolják. HeLa sejteket és HaCaT sejteket tranziensen transzfektálva és stabilan transzformálva azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált 3 génszakasz közül egy (a 696 jelű, amely a PRINS cDNS 696 nt-jánál kezdődő oligo) csökkentette a PRINS gén expresszióját. Az ugyanezzel a szakasszal transzfektált sejtek esetében a sejtek proliferációjának csökkenését tapasztaltuk, amely arra utal, hogy a PRINS génnek szerepe lehet a sejtek stresszválaszában. Mikroszkópos megfigyeléseink szerint HeLa sejtekben a PRINS csendesítése abnormális sejtmorfológiát eredményez: a HeLa sejtektől eltérően orsó alakúak, nyúlványosak, a kolóniaképzés folyamán nem alakul ki közöttük a normál sejt-sejt kontaktus, hanem eredeti, orsó alakú formájukban, nagy sejtközzötti tereket hagyva tapadnak a tenyésztőedény aljára. Egy további kísérletben arra kerestük a választ, hogy ezekben a megváltozott morfológiájú HeLa sejtekben a PRINS gén expressziójának csendesítése milyen génexpressziós változásokhoz vezetett. Ennek érdekében DNS chip vizsgálatokat végeztünk az MTA SZBK Funkcionális Genomikai Laboratóriumával együttműködésben, melynek során a PRINS csendesített és kontroll HeLa sejtekben 18.000 gén expressziójának szintjét hasonlítottuk össze. A kísérlet eredményeképpen számos olyan gént azonosítottunk, amely up-regulálódott, valamint számos olyat is, amely down-regulálódott a HeLa sejtekben a PRINS gén csendesítésének következtében. Ezeknek a géneknek az expresszióját a

továbbiakban real-time RT-PCR technikával vizsgáltuk, így elvégeztük a DNS chip eredményeinek validálását. Ezt követően néhány gén expressziójának mértékét összehasonlítottuk egészséges, pikkelysömörös tünetmentes, valamint tünetes epidermiszben. Az egyik transzkriptum expressziójának mértéke kilencszeres volt az epidermiszben és háromszázszoros volt a tünetes pikkelysömörös epidermiszben az egészséges epidermiszhez összehasonlítva. Homológia kereséssel bizonyítottuk, hogy ez a transzkriptum az G1P3 interferon- α indukált génről íródik át, amelyről egy japán munkacsoport 2005-ben közölt munkájában megmutatta, hogy egy olyan fehérjét kódol, amely az apoptózis szabályozásában játszik szerepet, a mitokondriumban lokalizálódik és számos gasztrointesztinális tumorban ill. a belőlük izolált sejtvonalakban extrém magas szinten expresszálódik. Jelenleg is folyó munkánkban ennek a génnek a jellemzésén dolgozunk a hiperproliferatív bőrbetegségben, a pikkelysömörben. Megmutattuk, hogy a G1P3 gén számos humán szervben és szövetben kifejeződik, de expressziójának mértéke nagy különbségeket mutat, legmagasabb szinten a vénákban, legalacsonyabb szinten a szájnyalvárában fejeződik ki.

2003-ban a Szegedi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati, valamint Sebészeti Klinikáival közreműködve létrehoztunk egy RNS/cDNS bankot, amely különböző szervekből és szövetekből származik. A PRINS gén egy szakaszát klónoztuk és kvantitatív Real Time PCR reakciókkal mértük, hogy az eredetileg epidermiszben azonosított PRINS gén egyéb szervekben és szövetekben milyen mértékben fejeződik ki. Eredményeink szerint a vizsgált 16 különböző szövet mindegyikében kifejeződik a PRINS gén, kifejeződés mértéke azonban nagymértékben különbözik: legalacsonyabb a szívizomban (0,023 fmol/ng totál RNS), és legmagasabb a vénákban (0,425 fmol/ng totál RNS). Az epidermiszben, amelyből eredetileg azonosítottuk a gént, viszonylag alacsony szinten (0,03 fmol/ng totál RNS) fejeződik ki. További terveink szerint a PRINS gén expresszióját egy, a fentiekhez hasonlóan különböző bőrbetegségekből létrehozandó RNS/cDNS mintagyűjteményben vizsgálánk. Ezek a vizsgálatok arra adnak majd választ, hogy a PRINS gén magas szintű expressziója mennyire jellemző a különböző hiperproliferatív ill. gyulladásos bőrbetegségekre. A Klinikánkon működő Plasztikai Sebészeti Osztállyal együttműködésben jelenleg is folyik az a gyűjtőmunka, melyben különböző hiperproliferatív benignus és malignus, valamint gyulladásos kórképekből szövetminta/RNS/cDNS gyűjteményt állítunk össze, a továbbiakban ezeken a mintákon fogjuk tanulmányozni a PRINS gén, valamint újabb kandidátus gének expresszióját.

A PRINS gén expressziójának és szerepének tanulmányozására különböző vizsgálatokat végeztünk pikkelysömörös nem léziós és léziós mintákon. Számos független egészséges és pikkelysömörös mintában hasonlítottuk össze a PRINS gén expresszióját kvantitatív Real Time PCR vizsgálatokkal. Eredményeink szerint az egészséges epidermiszben igen alacsony szinten fejeződik ki a PRINS gén, a pikkelysömörös nem léziós epidermiszben detektáltuk a legmagasabb szintű kifejeződést és valamivel alacsonyabb expressziót a tünetes pikkelysömörös epidermiszben. Egy másik kísérletsorozatban egészséges és pikkelysömörös nem léziós "shave biopsy"-ákat organotipikus kultúrákban kezeltünk olyan T-lymphokinekkal ($\text{INF}\gamma$, IL-3, GM-CSF), amelyek a pikkelysömörös epidermiszben felelősek a keratinociták hiperproliferációjának indukciójáért. Eredményeink szerint az egészséges epidermiszben a PRINS gén expressziója nem változott a fenti citokinekkal való kezelésre, míg a pikkelysömörös nem léziós epidermiszben a PRINS gén expressziója az $\text{INF}\gamma$ +IL-3+GM-CSF citokin keverékkel való kezelés hatására erősen lecsökkent. Ez az eredmény nagyon jó egyezést mutat azzal a megfigyeléssel, hogy a PRINS gén expressziója alacsonyabb szintű a pikkelysömörös tünetes epidermiszben, mint a nem léziós epidermiszben.

Annak érdekében, hogy a pikkelysömörös tünetek kialakulásának korai stádiumában bekövetkező génexpressziós változásokat detektáljuk, a fent részletesen ismertetett organotipikus kultúrákat használtunk medellként, majd DNS chip kísérletekben hasonlítottuk össze az expressziós mintázatokat. Ezeket a vizsgálatokat szintén MTA SZBK Funkcionális Genomikai Laboratóriumával együttműködésben végeztük el, jelenleg folyik a chip kísérlet eredményeinek real-time RT-PCR-ral való validálása.

Az MTA SZBK Biofizikai Intézetében Dr. Krizbai Istvánnal indított együttműködésünk keretében azt vizsgáljuk, hogy humán agyi endotél sejtekben hogyan fejeződik ki a PRINS gén és vajon a HaCaT sejtekhez és a humán keratinocitákhoz hasonlóan különböző stressz hatásokra a gén expressziójának szintje megnövekedik-e. Eddigi eredményeink szerint a PRINS gén a HaCaT sejtekben és a keratinocitákban megfigyelt szinten expresszálódik agyi endotél sejtekben is, valamint oxidatív és ozmotikus stressz hatására a gén expressziójának mértéke fokozódik.

Egy 2005. őszén indult alprojektünkben arra keressük a választ, hogy a PRINS RNS vajon milyen fehérje/DNS/RNS kompartmentekhez kötődve funkcionál a sejtekben. Ezekhez a vizsgálatainkhoz a PRINS gén bizonyos szakaszait *in vitro* transzkripcióval átírjuk RNS-sé, majd keratinocita ill. HaCaT sejt lizátumokkal reagáltatjuk. A képződött komplexek detektálása RNS EMSA (electrophoretic mobility shift assay) vizsgálatokkal történik.

Mindezeket a munkákat Dr. Antal Máriával együttműködésben végezzük az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetében.

Munkánk eredményét eddig három közleményben foglaltuk össze: Széll M, Sonkoly E, Bata-Csörgő Zs, Pivarcsi A, Polyánka H, Kenderessy Szabó A, Szentpáli K, Molnár G, Kemény L: *PRINS: egy új nem kódoló RNS gén azonosítása, expressziójának vizsgálata pikkelysömörben, valamint különböző humán szövetekben és szövetekben. Bőrgyógy Vener Szle 80: 255-260, 2004*, valamint Sonkoly Enikő, Bata-Csörgő Zsuzsanna, Pivarcsi Andor, Polyánka Hilda, Kenderessy-Szabó Anna, Molnár G, Szentpáli Károly, Megyeri Klára, Mándi Yvette, Dobozy Attila, Kemény Lajos, Széll Márta. *Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. J Biol Chem 280: 24159-67, 2005*; és Széll Márta, Bata-Csörgő Zsuzsanna, Sonkoly Enikő, Dobozy Attila, Kemény Lajos: *Genomikai kutatások a bőrgyógyászatban. Magyar Tud. 166: 688-699, 2005*.

Amint az a bevezetésben említésre került, munkánk „alapkövét” egy 2000-ben elvégzett „differential display” vizsgálat képezte, melyben a pikkelysömörös tünetmentes és egészséges epidermisz expressziós mintázatát hasonlítottuk össze és választottunk ki további munkára néhány érdekesnek bizonyuló gént. Az azóta eltelt időszakban a fent ismertetett munkák ezeknek a géneknek a részletes jellemzése volt. 2005. őszén elkezdjük azoknak a transzkriptumoknak a további jellemzését is, amelyekkel az elmúlt 5 évben nem volt módunk dolgozni. Érdeklődésünk középpontjába az ún. „reggie” fehérje komplex került, amely egy a sejtfelszíni receptorok és a citiszkkeleton közötti kapcsolat létrehozásában, jelátviteli folyamatokban részt vevő sejtmembrán struktúra. Eredményeink szerint a „reggie” komplex három fehérjekomponensét (SPFH fehérje, vinkulin, Rho GTPase) kódoló gének expressziója bizonyult up-reguláltnak a pikkelysömörös tünetmentes epidermiszben az egészséges epidermisszel való összehasonlításban. A közeljövőben tervezzük a „differential display” kísérlet eredményét validálni real-time RT-PCR módszerrel, majd részletesen jellemezni ezt a három gént és fehérjét a pikkelysömör pathogenezisében, ill. szerepüket a keratinociták proliferációjának/differenciációjának szabályozásában.

Fényterápiás eljárások kidolgozása pikkelysömör és egyéb bőrgyógyászati ill. allergológiai kórképek kezelésére

Szintén a pikkelysömör betegséggel kapcsolatosak azok a kutatásaink, melyeknek célja a klinikánkon a betegség kezelésére elsőként bevezetett 308 nm-en emittáló XeCl lézer

hatásmechanizmusának vizsgálata. Ismert, hogy a pikkelysömör kezelésére használt különböző hullámhosszú UV-fény kezelések a betegség pathomechanizmusában alapvető szerepet játszó T-sejtek apoptózis-indukcióján keresztül fejtik ki hatásukat. Az UV fény immunszuppresszív hatását rendszeresen alkalmazzuk a bőrgyógyászati terápiában. Az UVB tartományból leghatékonyabbnak tartják a 305-315 nm hullámhosszúságú fényt, emiatt a fényterápiában legelterjedtebben az ún keskeny spektrumú („narrow-band”, NB-UVB) fényforrást alkalmazzák. Kutatócsoportunk alkalmazott először 308 nm xenon chlorid (XeCl) lézerrel fénykezelést pikkelysömörben, vitiligóban, valamint atópiás dermatitisben. A psoriasis XeCl lézerkezelése mellett a remisszió is hosszabb, mint a hagyományos fénykezelés során. Eredményeink szerint a 308 nm XeCl excimer lézer hatékonyabban indukál T sejt apoptózist, mint az NB-UVB fény. Megállapítottuk továbbá, hogy az UVB fény T sejt apoptózist indukáló hatása nem csak a fény hullámhosszúságától, hanem annak intenzitásától is függ, az ezzel kapcsolatos vizsgálatainkat már az OTKA Tudományos Iskola Pályázat kereteiben végeztük és ezzel kapcsolatosan egy közlemény is született: *Novák Z, Bérces A, Rontó Gy, Pállinger É, Dobozy A, Kemény L: Efficacy of different UV-emitting light sources in the induction of T-cell apoptosis. Photochem Photobiol 79: 434-439, 2004 (IF: 1,359)*. Az SZTE Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika és az SZTE Optika és Kvantumelektronikai Tanszéke által elsőként alkalmazott excimer lézerkezelés FDA engedéllyel alkalmazott orvosi kezelés az USA-ban, és ma már 6 lézergyártó cég állít elő és forgalmaz excimer lézert bőrbetegségek kezelésére.

Újabb vizsgálataink szerint az UV fény nem csak a késői típusú túlérzékenységi reakciót gátolja, hanem az azonnali típusú túlérzékenységi választ is. Kimutattuk, hogy mind az XeCl excimer lézer, mind pedig az UV/VIS fény gátolja az allergénnel kiváltott Prick tesztet a bőrben. Ezen eredményeinkkel összhangban, klinikai vizsgálataink arra utalnak, hogy mind a XeCl lézer, mind pedig az UV/VIS fény gátolja a rhinitis allergica (szénanátha) klinikai tüneteit is. Eredményeink szerint az intranasalis fototerápia csökkenti az orrmosó folyadékban az eozinophil sejtek számát, az eozinofil kationos protein (ECP), valamint az IL5 mennyiségét, és az UV/VIS fény *in vitro* az eozinofil sejtek apoptózist okozza. A fenti kutatási eredmények alapján az ETT TUKEB a rhinitis allergica kezelésére alkalmas orvosi kezeléssé nyilvánította az intranazális fényterápiát. Magyarországon jelenleg mintegy 60 centrumban történik a Rhinolight® fénykezelés. A kezeléshez alkalmazott Rhinolight® fényterápiás eszköz CE jelzéssel ellátott orvosi műszer.

Genomikai vizsgálatok lábszárfekélyben

A szintén multifaktoriális hátterű, krónikus vénás elégtelenség talaján kialakuló lábszárfekély az érintett betegek életminőségének rendkívüli mértékű romlását okozza, a keletkező nehezen gyógyuló sebek sokszor nagy problémát jelentenek a bőrgyógyászati ellátásban. A bőrbetegség pontos pathomechanizmusa mindeddig ismeretlen. Célunk az volt, hogy olyan genetikai eltéréseket azonosítsunk, amely(ek) szerepet játszanak a lábszárfekély kialakulásában. Ismert, hogy a fibroblaszt növekedési faktorok részt vesznek a sebgyógyulás szabályozásában, hatásaikat transzmembrán tirozin kináz receptorokon fejtik ki, ezek közül egy a fibroblaszt növekedési faktor receptor 2 (FGFR2). Vizsgálataink során célul tűztük ki olyan biológiai funkcióval még nem jellemzett FGFR2 génpolimorfizmus (SNP) azonosítását, mely szerepet játszhat az elhúzódó sebgyógyulás, illetve a lábszárfekély kialakulásában. Mutációspecifikus TaqMan próbával azonosítottunk a 3' nem transzlálódó régióban (UTR) egy SNP-t (2451 A→G), melynek allélgyakorisága szignifikánsan különbözik (χ^2 $p=0,0103$) az általunk vizsgált 82 lábszárfekélyes és 82 egészséges egyén között. Feltételezzük, hogy ez az SNP a génről átíródó mRNS-ek (keratinocita növekedési faktor receptor mRNS, KGFR és bakteriálisan expresszált kináz mRNS, BEK) stabilitását csökkenti, receptor diszfunkcióhoz vezet és hozzájárul a lábszárfekélyekben tapasztalható kóros epithelizációhoz és vaszkularizációhoz. Azonosítottunk egy konzervált cisz-ható elemet 5' irányban az általunk vizsgált SNP-től, amely bizonyítottan hatással van az átíródó mRNS-ek stabilitására. Jelenleg a KGFR és BEK izoformák génexpresszióját vizsgáljuk humán epidermiszben és dermiszben. Eredményeink szerint a KGFR izoforma magas szinten fejeződik ki az epidermiszben és alacsony szinten a dermiszben, míg a BEK mRNS izoformát sem az epidermiszben, sem a dermiszben nem tudtuk detektálni. Vizsgálataink eredményét közleményben foglaltuk össze, amelyet a *The Journal of Investigative Dermatology* c. lap közlésre elfogadott: Nagy N, Szolnoky Gy, Szabad G, Bata-Csörgő Zs, Dobozy A, Kemény L, Széll M: *Single nucleotide polymorphisms of the fibroblast growth factor receptor 2 gene in patients with chronic venous insufficiency with leg ulcer.*

További kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a sebgyógyulásban érintett gének kifejeződése, mint a KGFR, NRP1 (neurofilin 1), SDC4 (szindekán 4) gének, mutatnak-e különbséget az egészséges és a fekélyes betegek epidermiszében. Az NRP1 gén az epidermiszben és a dermiszben is kifejeződik, transzmembrán receptorokat kódol, melyeknek elsősorban az angiogenezisben és feltehetőleg a keratinociták migrációjában van szerepük. Az SDC4 gén a dermiszben és az endothélsejtekben fejeződik ki, és a fibroblasztokra hatva fejti

ki hatását a sebgyógyulás során. Vizsgálatainkat lábszárfekélyes és egészséges egyénekből vett shave biopsziás bőrmintákon végeztük, melyekben az epidermiszt és a dermiszt diszpáz enzim segítségével választottuk szét. Az mRNS szintű kifejeződést quantitativ real-time RT-PCR technikával, a fehérje szintű kifejeződést Western blott technikával vizsgáltuk. Eredményeink szerint a lábszárfekélyes betegek epidermiszében a KGFR, az NRP1 és az SDC4 gén is alacsonyabb kifejeződést mutatott mRNS szinten, mint az egészséges betegek epidermiszében. Az NRP1 és az SDC4 esetében mintegy 10-szeres, a KGFR esetében mintegy 4-szeres génexpressziós különbséget találtunk a lábszárfekélyes és az egészséges egyének között. Azonban a vizsgált gének kifejeződésének szintjében mind a lábszárfekélyes és az egészséges egyének csoportjában is jelentős egyéni különbségek mutatkoztak. A fehérje szintű génexpressziós vizsgálatok jelenleg is folyamatban vannak.

Tekintettel a lábszárfekélyes és egészséges egyének esetében tapasztalt jelentős génexpressziós különbségekre, vizsgálatainkat kiterjesztettük az NRP1 és SDC4 gének SNP-inek vizsgálatára is. Mutációspecifikus TaqMan próbával azonosítottunk az SDC4 gén 1. exonjában egy SNP-t (-526 G→A), melynek allélgyakorisága szignifikánsan különbözik (Chi2 $p=0,0186$) az általunk vizsgált 46 lábszárfekélyes és 46 egészséges egyén között. SNP vizsgálatainkban további lábszárfekélyes és egészséges egyén bevonásával a vizsgált egyének számát szeretnénk növelni, vizsgálatainkat jelenleg is folytatjuk.

A KGFR gén esetében a lábszárfekélyes és egészséges egyének közötti jelentős expressziós különbségek miatt keratinocitákat izoláltunk, és MTT assay-el azt tapasztaltuk, hogy KGF indukció hatására az FGFR-2 gén 3' UTR-ben SNP-t hordozó egyénekből származó keratinociták másképpen reagálnak, mint a vad típusú allélt hordozók. Eredményeinket további vizsgálatokkal szeretnénk alátámasztani.

Vizsgálatok acne vulgarisban

A pattanás (acne vulgaris) az egyik leggyakoribb, gyulladásos bőrbetegség, hátterében számos genetikai faktor és a környezeti, életmódbeli tényezők is fontos szerepet játszanak. Egyik legfontosabb pathogenetikai faktora a bőrön természetes módon is jelen levő, az acne-ban fokozott proliferációt mutató of *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) baktérium. Vizsgálataink célja az volt, hogy kiderítsük, a humán keratinociták *P.acnes* infekciója hogyan váltja ki a gyulladásos és az acne-ra jellemző túlzott elszarusodási folyamatokat. Különböző *P. acnes* izolátumokat használtunk vizsgálatainkhoz és azt tapasztaltuk, hogy az egyes

izolátumok között nagy különbségek vannak a keratinociták veleszületett immunitásban szerepet játszó fehérjéinek indukciója tekintetében. Kísérleteink során a β -defensin-2 (hBD2) és interleukin-8 (IL-8) mRNS és fehérje szintű változásait vizsgáltuk. Blokkolási kísérletekkel igazoltuk, hogy a keratinociták *P. acnes* indukcióját követően a veleszületett immunitásban szerepet játszó antimikrobiális anyagok indukciójához mind a TLR2, mind a TLR4 receptorok által mediált jelátviteli utakra szükség van. Eredményeinket közleményben foglaltuk össze, melyet a The Journal of Investigative Dermatology c. lapban közlésre elfogadtak: Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L: *Distinct strains of Propionibacterium acnes induces selective human keratinocytes through Toll-like receptors. J Invest Dermatol* 124: 931-38, 2005

A közelmúltban száznál több klinikai *P. acnes* törzs ún. RAPD vizsgálatát végeztük el annak érdekében, hogy genotipizáljuk őket, majd az egyes, elkülönített csoportok esetében megállapítsuk, milyen mértékben indukálják a keratinociták antimikrobiális folyamatait. Eredményeink szerint az acne-s betegek bőréről és a haemokultúrákból izolált *P. acnes* törzsek RAPD mintázatai nem mutatnak alapvető különbségeket, így módon tehát nem elkülöníthetők az acne pathogenezisében szerepet játszó törzsek.

Egy másik, közelmúltban indult kísérletsorozatunkban acne vulgaris-ban szenvedő betegek genomi DNS-ének felhasználásával vizsgáljuk az interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), a TLR2 és TLR4 gének olyan polimorfizmusait, melyeket számos más gyulladásos betegséggel asszociáltan detektáltak más munkacsoportok. 75 acne vulgaris, 18 acne inversa beteg, illetve 38 kontroll egyén esetén vizsgáltuk az IL-1RN gén ún. variable number of tandem repeat (VNTR) polimorfizmusát, valamint a TLR2 gén Arg677Trp és Arg753Gln aminosav-változást okozó polimorfizmusait, illetve a TLR4 Asp299Gly és Thr399Ile aminosav-változást okozó polimorfizmusait. Az IL-1RN gén intron 2 szakaszában található 86-bp nagyságú ismétlődő szakasz különböző példányszámban fordulhat elő. A leggyakrabban előforduló allélok, az allél 1, allél 2 és allél 3, sorrendben 4, 2, illetve 5 ismétlődést tartalmaznak. Az IL-1RN gén allél 2 formájának, illetve a TLR2 és TLR4 gének általunk vizsgált polimorfizmusainak összefüggését korábban már számos betegséggel kapcsolatban megtalálták. Munkánk során a vizsgált személyek genomi DNS-ét PCR-rel amplifikáltuk, majd az alléleket gél elektroforézissel detektáltuk az IL-1RN esetén, illetve szekvenálással a TLR polimorfizmusok esetén. Nem találtunk különbséget a TLR4 SNP-k előfordulásában, illetve egyik TLR2 SNP sem volt jelen a vizsgált populációkban. Az IL-1RN gén két ismétlődést tartalmazó allél 2 formájának gyakoriságát, illetve az allél 2 homozigóták

előfordulását gyakoribbnak találtuk az acne vulgaris betegek esetében, mint az acne inversásoknál és a kontroll populációban. Eredményeink arra utalnak, hogy az IL-1RN gén allél 2 variánsának előfordulása - egyéb gyulladásos és autoimmun betegségeknél tapasztaltakhoz hasonlóan - hozzájárulhat az acne vulgaris kialakításához. Előzetes eredményeink alátámasztásához további acne vulgaris-os betegeket vonunk be vizsgálatainkba. A témában a közelmúltban készült el egy kézirat, melyet a Dermatology c. lapban fogunk közzéadni: *A. Koreck, K. Kis, K. Szegedi, V. Paunescu, R. Cioaca, R. Olariu, L. Kemen, A. Doboz, M. Szell: TLR2 and TLR4 polymorphisms are not associated with acne vulgaris*

Immunológiai vizsgálatok allergiás kontakt dermatitiszben

Egy másik kutatási programunkban a hisztamin szerepét vizsgáltuk az allergiás kontakt dermatitisz pathogenezisében. Vizsgálatainkhoz hisztidin dekarboxiláz knock-out egereket használtunk, amelyeket az allergiás reakció kiváltására dinitrofluorobenzénnel (DNFB) kezeltünk. Méréseinkkel célunk az volt, hogy a Th1 és Th2 irányú immunválaszban részt vevő sejteket ill. citokineket detektáljuk. Mivel a knock-out egerekben a DNFB kezelést követően magasabb szintű Th1 citokin mRNS expressziót, valamint felfokozott mértékű reakciót (a kezelt egerek ödémája a fülön) tapasztaltunk, feltételezzük, hogy a hisztamin a késői típusú kontakt dermatitiszben negatív reguláló szerepet tölt be. Az eredményeinket összefoglaló közleményt az International Immunology lapban közzéltük: *Garaczi E, Széll M, Jánossy T, Koreck A, Pivarcsi A, Buzás E, Pos Z, Falus A, Doboz A, Kemény L: Negative regulatory effect of histamine in DNFB induced contact hypersensitivity. Int Immunol 16:1781-1782, 2004 (IF: 3,69)*

A keratinocita növekedési faktor (KGF) és receptorának (KGFR) expressziós vizsgálata a gasztrointesztinális reflux betegség pathogenezisében

Mivel munkacsoportunk igen jó műszaki háttérrel rendelkezik, és nagy gyakorlata van génexpressziós mérésekben, a SZTE Sebészeti Műtéttani Intézetével együttműködve olyan vizsgálatokat végeztünk, amelyek a gasztrointesztinális reflux betegség (GERD) hátterében álló molekuláris szintű változásokat követi. Kísérleteinkhez kutyákat használtunk és a kioperált nyelőcsődarabokat a gyomor refluxot modellező epe és epe/sósav keverékével

kezeltük, majd mértük a (keratinocita növekedési faktor) KGF és (keratinocita növekedési faktor receptor) KGFR gének expressziós változásait. Eredményeink szerint a fenti kezelések nagymértékű β -ATPáz expresszió csökkenést okoznak a nyelőcső izomrétegében, ami magyarázatul szolgálhat a korábbi vizsgálatokban tapasztalt ATP deplécióra, a kezelések következtében bekövetkező KGFR mRNS szint növekedés pedig a regenerációs folyamatok indukciójára utal. Az eredményeket összefoglaló közleményt az Inflammation Research c. lap fogadta el közlésre: *Szentpáli K, Paszt A, Lázár Gy, Széll M, Kemény L, Dobozy A, Kaszaki J, Tiszlavicz L, Iván L, Boros M: Esophageal ATP synthase and keratinocyte growth factor gene expression changes after acid and bile-induced mucosal damage. Inflamm Res 54: 152-57, 2005*

Most induló, szintén ko-operációban megvalósuló vizsgálatainkban ún. túlélő patkány modellben tanulmányozzuk a reflux által indukált kóros folyamatokat kísérő génexpressziós változásokat. Jelenlegi vizsgálatainkban a p53, a COX-2 és a cyclin D1 gének gén és fehérje expressziós változásait követjük a patkány reflux modellben.

A pályázat keretében készült Ph.D. értekezések

Mivel a hároméves futamidejű pályázatnak prioritása volt a fiatal kutatók munkájának támogatása, nagy hangsúlyt fektettünk a feladatok végrehajtásában részt vevő fiatalok tudományos képzésére. Ennek eredményeképpen 3 Ph.D. értekezés született a témában, melyeket 2004-ben, valamint 2005-ben védtek meg fiatal kollégáink:

Dr. Novák Zoltán: Ultraviolet B-induced T cell apoptosis: implication for phototherapy

Témavezető: Dr. Kemény Lajos

Dr. Csoma Zsanett Phototherapy in the treatment of allergic rhinitis

Témavezető: Dr. Kemény Lajos

Dr. Sonkoly Enikő: Identification and characterization of a novel psoriasis-susceptibility related RNA gene, PRINS

Témavezető: Dr. Széll Márta